

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

GERMAIN & MAUREAU
Boîte postale 6153
F-69466 Cedex 06 Lyon
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 16 janvier 2002 (16.01.02)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire MD/B05B3441	
Demande internationale no PCT/FR00/02202	Date du dépôt international (jour/mois/année) 31 juillet 2000 (31.07.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:			
<input checked="" type="checkbox"/> le déposant	<input checked="" type="checkbox"/> l'inventeur	<input type="checkbox"/> le mandataire	<input type="checkbox"/> le représentant commun
Nom et adresse ANDRE, Patrice 6, rue Victor Basch F-35700 Rennes FRANCE		Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
		no de téléphone	
		no de télécopieur	
		no de téléimprimeur	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:			
<input type="checkbox"/> la personne	<input type="checkbox"/> le nom	<input checked="" type="checkbox"/> l'adresse	<input type="checkbox"/> la nationalité <input type="checkbox"/> le domicile
Nom et adresse ANDRE, Patrice 5, rue Servient F-69003 Lyon FRANCE		Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
		no de téléphone	
		no de télécopieur	
		no de téléimprimeur	
3. Observations complémentaires, le cas échéant:			
4. Une copie de cette notification a été envoyée:			
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés		
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés		
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:		

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Jocelyne REY-MILLET
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire:

GERMAIN & MAUREAU
Boîte postale 6153
F-69466 Cedex 06 Lyon
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 16 janvier 2002 (16.01.02)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire MD/B05B3441	
Demande internationale no PCT/FR00/02202	Date du dépôt international (jour/mois/année) 31 juillet 2000 (31.07.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse LOTTEAU, Vincent Le Bourg F-71460 Vaux en Pré FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse LOTTEAU, Vincent 68ter Chemin Balmes F-69390 Vourles FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Jocelyne REY-MILLET no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition 08 février 2001 (08.02.01)	
Demande internationale no: PCT/FR00/02202	Référence du dossier du déposant ou du mandataire: MD/B05B3441
Date du dépôt international: 31 juillet 2000 (31.07.00)	Date de priorité: 30 juillet 1999 (30.07.99)
Déposant: ANDRE, Patrice etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

04 décembre 2000 (04.12.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: J. Zahra no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---

TRAITE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 23 NOV 2001

WIPO PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

15 +

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B05B3441MD/DGR	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02202	Date du dépôt international (jour/mois/année) 31/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 30/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N7/00		
Déposant BIO MERIEUX et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.

2. Ce RAPPORT comprend 9 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

I ☒ Base du rapport

II ☒ Priorité

III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle


IV ☒ Absence d'unité de l'invention

V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

VI ☐ Certains documents cités

VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale

VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 04/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 21.11.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: <div style="text-align: center;">  </div> Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Buchet, A N° de téléphone +49 89 2399 7401



I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-24 version initiale

Revendications, N°:

1-24 version initiale

Dessins, feuilles:

1/1 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02202

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

II. Priorité

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :
- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
 - ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
2. ☒ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a
- ☐ limité les revendications.
 - ☐ payé des taxes additionnelles.
 - ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
 - ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.
2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/02202

3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,

- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
- ☒ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
voir feuille séparée

4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :

- ☒ toutes les parties de la demande.
- ☐ les parties relatives aux revendications n°s .

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 5, 7-9, 12, 18 Non : Revendications 1-4, 6, 10-11, 13-17, 19-24
Activité inventive	Oui : Revendications Non : Revendications 1-24
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-24 Non : Revendications

2. Citations et explications voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: US 5 766 919 A
- D2: WO 94/25064
- D2: Journal of Medical Virology
vol. 57, n° 3, 1999, pp 223-229
- D3: Atherosclerosis
vol. 137, n° 2, 1998, pp 329-340

- D1 décrit une méthode de réplication du génome du virus de l'hépatite C (HCV): une cellule animale (par exemple T) est infectée par le virus provenant du sérum ou du plasma d'un malade infecté, puis elle est cultivée. Il est possible d'utiliser du HCV présentant une forte ou une plus faible virulence: la fraction avec un fort pouvoir infectieux a une densité inférieure ou égale à 1.06 g/ml sur un gradient de sucrose alors que la fraction de moindre virulence a une densité supérieure (1.13 g/ml et plus) et est associée à des immunoglobulines humaines (anticorps anti-HCV générés par l'hôte humain et reconnus par des anticorps anti-immunoglobulines). Le stock de particules anti-virales ainsi obtenu peut servir au diagnostic ou à l'identification d'agents anti-viraux.

- D2 propose d'infecter, éventuellement de manière répétée, des cellules hépatiques avec du sérum d'un patient infecté par HCV afin d'obtenir un stock de particules virales non contaminées (revendications 11 et 14). Pour diminuer la toxicité du plasma ou du sérum, un passage sur gradient de sucrose est proposé (revendication 5).

- D3 révèle que les récepteurs des lipoprotéines à faible densité (LDLR) jouent vraisemblablement le rôle de récepteur pour le virus HCV. Il était déjà connu que les particules virales ont la capacité à se lier aux lipoprotéines et aux immunoglobulines. En faveur de cette hypothèse, D2 montre que l'ajout de LDL synthétique bloque l'attachement du HCV aux fibroblastes humains, en entrant en compétition avec les particules virales complexées aux lipoprotéines. Par ailleurs, HCV devient capable de se fixer à des cellules COS-7 si celles-ci sont transformées par le gène du LDLR humain. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle dans l'infection des cellules (Fig. 4).

- D4 révèle que l'ajout d'acides gras insaturés, en particulier l'acide oléique à 0.3 mM

dans 1% de BSA module l'activité *in vitro* des récepteurs des lipoprotéines à faible densité (LDLR).

Concernant le point II

Priorité

- Une analyse préliminaire du document de priorité indique que la présence d'immunoglobulines humaines dans la fraction contenant les particules virales et les lipoprotéines n'est pas évoquée. De ce fait, la revendication 2 ne bénéficie pas de la priorité revendiquée.

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

- Les revendications 1 à 15 portent sur un procédé de répllication *in vitro* des virus des familles *Togaviridae* et *Flaviviridae*;
 - La revendication 16 revendique un milieu n'ayant pas spécifiquement trait à la méthode évoquée mais adapté d'une manière générale à la culture cellulaire;
 - Les revendications 17 à 22 portent sur des procédés et des compositions tirant avantage de la disponibilité de particules virales, éventuellement obtenues par le procédé de l'invention;
 - La revendication 23 se rapporte à des composés ayant un effet sur la voie d'endocytose associée aux récepteurs des lipoprotéines;
 - La revendication 24 se base sur l'utilisation de lignées cellulaires infectées, éventuellement par le procédé de l'invention, pour identifier des molécules anti-virales.
- Ostensiblement, ces revendications apportent des solutions distinctes à des problèmes techniques différents. De ce fait, la présente demande ne remplit pas les conditions d'unité de l'invention (Règle 13 PCT).

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive

et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1) Nouveauté:

- L'expression "fraction de LVPs" utilisée dans les revendications 1 et 2 n'a aucune signification claire puisqu'elle n'a jamais été utilisée dans l'art antérieur. Par ailleurs, les expériences d'infection réalisées dans D1 correspondent aux procédés revendiqués aux revendications 1 et 2 puisque les fractions isolées par gradient contiennent d'une manière inhérente ou démontrée des particules virales associées à des lipoprotéines et éventuellement à des immunoglobulines humaines. De même, la capacité des cellules de D1 à être infectées révèlent qu'elles possèdent d'une manière inhérente la voie identifiée aux revendications 1 et 2. De ce fait, D1 prive les revendications 1-4, 14-15, 17, 19-22 et 24 de nouveauté.

- Les mêmes remarques s'appliquent pour D2. En outre, le milieu auquel il est fait référence aux revendications 11 et 16 semble correspondre à celui décrit p 15, l 22 à 29 de D2. De ce fait, D2 anticipe l'objet des revendications 1, 3-4, 6, 10-11, 13-17, 19-22 et 24.

- La solution de LDL utilisée dans D3 tombe dans la définition de la revendication 23.

- Le milieu décrit dans D4 correspond à celui revendiqué à la revendication 16.

- Pour toutes ces raisons, les revendications 1-4, 6, 10-11, 13-17 et 19-24 ne remplissent pas les conditions énoncées à l'Article 33.2 PCT.

- En revanche, les revendications 5, 7-9, 12 et 18 satisfont aux conditions de nouveauté énoncées à l'Article 33.2 PCT.

2) Activité inventive:

- Cependant, leur objet ne semble pas relever d'une démarche inventive:

- L'effet bénéfique d'un agent modulateur de l'apoptose sur des cellules infectées par

HCV (revendications 8 et 9) est connu de l'homme du métier et n'a pas de relation directe avec l'invention.

- L'objet de la revendication 18 est considéré comme une mesure de routine pour l'homme du métier.

- Les revendications 5, 7 et 12 ont plus directement trait à l'invention: la mise en évidence que les virus de cette famille sont internalisées dans les cellules hôtes via la voie d'endocytose associée aux récepteurs des lipoprotéines. Il est considéré que cette propriété était déjà utilisée dans D1 et D2 sans que le mécanisme mis en jeu ne soit clairement identifié. De ce fait, la cellule sélectionnée à la revendication 7 est simplement considérée comme une alternative à celles proposées dans D2. Par ailleurs, D3 qui avait démontré la liaison entre ces virus et ces récepteurs invitaient l'homme du métier à vérifier que cette liaison se répercutait au niveau de l'infection. D4 montrant que les acides gras insaturés stimulent l'endocytose par cette voie, l'objet des revendications 5 et 12 devient alors évident.

- Pour ces raisons, les revendications 1 à 24 ne satisfont pas aux conditions énoncées à l'Article 33.3 PCT.

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

- Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1 à D4 et ne cite pas ces documents.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

1) Il est à noter que les particules virales, les polypeptides ou les anticorps mentionnés aux revendications 17 à 22 sont définis par référence à la méthode qui a permis de les obtenir. Cette définition n'est pas claire et de plus, même si ladite méthode est nouvelle, ne rend pas nécessairement les produits nouveaux (voir Point V-1).

2) Il est à noter que la revendication 24 ne fait pas directement référence à l'invention. Cependant, même si un lien pouvait être établi par la méthode ayant permis d'obtenir la lignée cellulaire infectée, cette référence ne serait pas suffisante pour la rendre nouvelle (voir Point V-1).

3) Il est à noter qu'une caractéristique introduite par l'expression "en particulier" (revendication 9), "tel que" (revendications 9 et 13), "avantageusement" (revendications 12 et 16), "notamment" (revendication 13) ou "de préférence" (revendication 5) n'est pas prise en considération pour la définition de l'étendue de l'invention.

Translation
10/831439

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED
NOV 05 2002
TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference B05B3441MD/DGR	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02202	International filing date (day/month/year) 31 July 2000 (31.07.00)	Priority date (day/month/year) 30 July 1999 (30.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 7/00		
Applicant BIO MERIEUX		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☒ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 December 2000 (04.12.00)	Date of completion of this report 21 November 2001 (21.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02202

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-24 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-24 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/1 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02202

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☒ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

SEE SEPARATE SHEET

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02202

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

SEE SEPARATE SHEET

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/FR 00/02202**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.3

A preliminary examination of the priority document has indicated that the presence of human immunoglobulins in the fraction containing the viral particles and the lipoproteins has not been disclosed. As a result, Claim 2 does not enjoy the priority claimed.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

- Claims 1 to 15 relate to a method for the *in vitro* replication of viruses of the families *Togaviridae* and *Flaviviridae*;
- Claim 16 claims a medium which does not relate specifically to the method disclosed but which is, in a general manner, suitable for cell culture;
- Claims 17 to 22 relate to methods and compositions taking advantage of the availability of viral particles, that are optionally produced using the method of the invention;
- Claim 23 relates to compounds having an effect on the endocytosis pathway associated with the lipoprotein receptors;
- Claim 24 is based on the use of cell lines that are optionally infected using the method of the invention for the identification of anti-viral molecules.

These claims obviously provide separate solutions to separate technical problems. As a result, the present application does not fulfil the requirements of unity of invention (PCT Rule 13).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02202

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	5, 7-9, 12, 18	YES
	Claims	1-4, 6, 10-11, 13-17, 19-24	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-24	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: US 5 766 919 A

D2: WO 94/25064

D3: Journal of Medical Virology

Vol. 57, No. 3, 1999, pages 223-229

D4: Atherosclerosis

Vol. 137, No.2, 1998, pages 329-340

- D1 describes a method for replicating the genome of the hepatitis C virus (HCV): an animal cell (for example, a T cell) is infected with the virus from the serum or the plasma of an infected patient and is then cultured. HCV with a high or a lower virulence can be used: the fraction with high infectivity has a density less than or equal to 1.06 g/ml on a sucrose gradient, while the fraction with least virulence has a higher density (1.13 g/ml or more) and is associated with human immunoglobulins (anti-HCV antibodies generated by the human host and recognised by anti-immunoglobulin antibodies). The resulting stock of anti-viral particles can be used in the

diagnosis or the identification of anti-viral agents.

- D2 proposes infecting hepatocytes, optionally in a repeated manner, using the serum from a patient infected with HCV in order to produce a stock of non-contaminated viral particles (Claims 11 and 14). In order to reduce the toxicity of the plasma or the serum, purification on a sucrose gradient is proposed (Claim 5).
- D3 discloses that the low density lipoprotein receptors (LDLR) probably act as a receptor for HCV. It was already known that viral particles are capable of binding to lipoproteins and to immunoglobulins. In support of this hypothesis, D2 demonstrates that the addition of synthetic LDL blocks HCV attachment to human fibroblasts by competing with the viral particles complexed with the lipoproteins. Furthermore, HCV becomes capable of binding to COS-7 cells if said cells are converted by the human LDLR gene. This mechanism could play a role in the infection of the cells (Figure 4).
- D4 discloses that adding unsaturated fatty acids, in particular, oleic acid at 0.3 mM, to 1% of BSA modulates the *in vitro* activity of the low density lipoprotein receptors (LDLR).

1. Novelty:

- The expression "fraction of LVPs" in Claims 1 and 2 does not have a clear meaning because it has never been used in the prior art. Furthermore, the infection experiments carried out in D1 correspond to the methods claimed in Claims 1 and 2 because the fractions isolated by gradient contain, either inherently or in a manner that has been demonstrated, viral particles associated with lipoproteins and, optionally, with human immunoglobulins. Similarly, the capacity of the cells of D1 to be infected demonstrates that they inherently have the pathway identified in Claims 1 and 2. As a result, D1 deprives Claims 1-4, 14-15, 17, 19-22 and 24 of novelty.
- The same observations apply with respect to D2. What is more, the medium to which reference is made in Claims 11 and 16 appears to correspond to the one described on page 15, lines 22 to 29 of D2. It follows that D2 anticipates the subject matter of Claims 1, 3-4, 6, 10-11, 13-17, 19-22 and 24.
- The LDL solution used in D3 falls within the definition of Claim 23.
- The medium described in D4 corresponds to the one claimed in Claim 16.
- For all of these reasons, Claims 1-4, 6, 10-11, 13-17 and 19-24 do not fulfil the requirements of

PCT Article 33(2).

- Claims 5, 7-9, 12 and 18, on the other hand, fulfil the requirements of novelty of PCT Article 33(2).

2. Inventive step:

- However, the subject matter of said claims does not appear to involve an inventive step:
- The beneficial effect of an apoptosis-modulating agent on HCV-infected cells (Claims 8 and 9) is known to a person skilled in the art and does not have any direct relationship with the invention.
- The subject matter of Claim 18 is considered to be a routine measure for a person skilled in the art.
- Claims 5, 7 and 12 relate more directly to the invention: the demonstration of the fact that viruses of this family are internalised in the host cells via the endocytosis pathway associated with the lipoprotein receptors. This property is considered to have already been used in D1 and D2 although the mechanism involved was not clearly identified. As a result, the cell selected in Claim 7 is considered merely to be an alternative to those proposed in D2. Moreover, on the basis of D3, which had demonstrated the bond between these viruses and these receptors, a person skilled in the art would have been prompted to

check that this bond had an effect with respect to the infection. Since D4 has demonstrated that unsaturated fatty acids stimulate endocytosis by this pathway, the subject matter of Claims 5 and 12 is rendered obvious.

- For these reasons, Claims 1 to 24 do not fulfil the requirements of PCT Article 33(3).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not indicate the relevant prior art disclosed in documents D1 to D4, nor does it cite said documents.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. It should be noted that the viral particles, the polypeptides or the antibodies mentioned in Claims 17 to 22 are defined by means of reference to the method by which they are produced. This definition is not clear and, what is more, even if said method is novel, does not necessarily render the substances novel (see Box V, point 1 - Novelty).
2. It should be noted that Claim 24 does not refer directly to the invention. However, even if a link could be established by means of the method enabling production of the infected cell line, this reference would not be adequate to render same novel (see Box V, point 1 - Novelty).
3. It should be noted that a feature following the expressions "in particular" (Claim 9), "such as" (Claims 9 and 13), "advantageously" (Claims 12 and 16), "especially" (Claim 13) or "preferably" (Claim 5) is not taken into consideration for the definition of the scope of the invention.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire MD/B05B3441	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02202	Date du dépôt international (jour/mois/année) 31/07/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 30/07/1999
Déposant BIO MERIEUX		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

1
☐ Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

P R 00/02202

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N7/00 C12N5/10 C12N5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY
ABS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 766 919 A (YOSHIKURA HIROSHI ET AL) 16 juin 1998 (1998-06-16) colonne 5, ligne 55 -colonne 6, ligne 5 colonne 4, ligne 42-55	20-22, 24
Y	colonne 2, ligne 12 -colonne 3, ligne 5 colonne 4, ligne 17-21	1-6, 8-10, 13-15, 17-22
X	WO 94 25064 A (US ARMY) 10 novembre 1994 (1994-11-10) page 30, ligne 10 -page 31, ligne 28	20-22, 24
Y	page 8, ligne 25-31 page 9, ligne 1-7 page 9, ligne 20 -page 15, ligne 15 page 15, ligne 31 -page 16, ligne 21 revendications 3-5, 11, 14	1-6, 8-10, 13-15, 17-22
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/01/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ALCONADA RODRIG., A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>MONAZAHIAN MASYAR ET AL: "Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY MARCH, 1999, vol. 57, no. 3, mars 1999 (1999-03), pages 223-229, XP000864507 ISSN: 0146-6615 page 225, colonne de gauche, dernier alinéa -page 226, colonne de gauche, alinéa 2; figure 2</p> <p>----</p>	23,24
X	<p>US 5 679 342 A (WEINER AMY J ET AL) 21 octobre 1997 (1997-10-21) colonne 18, ligne 11 -colonne 20, ligne 54</p>	17,18, 20-22,24
A	<p>colonne 13, ligne 41-50</p> <p>----</p>	7
X	<p>BUCCI CECILIA ET AL: "Free fatty acids modulate LDL receptor activity in BHK-21 cells." ATHEROSCLEROSIS APRIL, 1998, vol. 137, no. 2, avril 1998 (1998-04), pages 329-340, XP000864506 ISSN: 0021-9150 page 334, colonne de gauche -page 336, colonne de droite figures 4,7</p> <p>----</p>	16
X	<p>KITA T ET AL: "ANTIBODY AGAINST LOW DENSITY LIPO PROTEIN RECEPTOR BLOCKS UPTAKE OF LOW DENSITY LIPO PROTEIN BUT NOT HIGH DENSITY LIPO PROTEIN BY THE ADRENAL GLAND OF THE MOUSE IN-VIVO" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1981, vol. 256, no. 10, 1981, pages 4701-4703, XP000864537 ISSN: 0021-9258 figures 2,3</p> <p>----</p>	23
X	<p>EDWARDS E H ET AL: "CASTANOSPERMINE INHIBITS THE FUNCTION OF THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR" BIOCHEMISTRY 1989, vol. 28, no. 19, 1989, pages 7679-7687, XP000891868 ISSN: 0006-2960 page 7683, colonne de gauche, alinéa 3 -page 7684, colonne de gauche, alinéa 1; figures 2,3</p> <p>----</p> <p>-/--</p>	23

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SEIPP STEFANIE ET AL: "Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 1997, vol. 78, no. 10, 1997, pages 2467-2476, XP002136094 ISSN: 0022-1317 le document en entier ---	1-24
X	YEN FRANCES T ET AL: "Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein." BIOCHEMISTRY 1994, vol. 33, no. 5, 1994, pages 1172-1180, XP000891746 ISSN: 0006-2960 page 1174, colonne de gauche, alinéa 1 figure 1 ---	16
A	---	3
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199840 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1998-462789 XP002136096 & JP 10 194988 A.(SUMITOMO SEIYAKU KK), 28 juillet 1998 (1998-07-28) abrégé ---	8,9
P,X	AGNELLO VINCENT ET AL: "Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA OCT. 26, 1999, vol. 96, no. 22, 26 octobre 1999 (1999-10-26), pages 12766-12771, XP002136095 ISSN: 0027-8424 page 12678, colonne de gauche, dernier alinéa -colonne de droite, alinéa 2; figure 3 page 12768, colonne de gauche, alinéa 4; tableau 2 -----	1,6,10, 14,15, 23,24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/02202

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5766919 A	16-06-1998	JP 5344889 A	27-12-1993
		JP 6125799 A	10-05-1994
		EP 0611393 A	24-08-1994
		WO 9325662 A	23-12-1993
		US 5552310 A	03-09-1996
WO 9425064 A	10-11-1994	AU 6943994 A	21-11-1994
US 5679342 A	21-10-1997	US 5968775 A	19-10-1999
		AT 188220 T	15-01-2000
		AU 668078 B	26-04-1996
		AU 9026791 A	11-06-1992
		CA 2095521 A	09-05-1992
		CA 2203443 A	09-05-1992
		CZ 9300824 A	13-04-1994
		DE 69131882 D	03-02-2000
		DE 69131882 T	04-05-2000
		DK 556292 T	17-04-2000
		EP 0556292 A	25-08-1993
		EP 0842947 A	20-05-1998
		ES 2139591 T	16-02-2000
		FI 932025 A	07-06-1993
		FI 971702 A	21-04-1997
		GR 3032771 T	30-06-2000
		HU 66063 A	28-09-1994
		JP 11071395 A	16-03-1999
		JP 6504431 T	26-05-1994
		NO 931680 A	28-06-1993
		NO 972213 A	14-05-1997
		PT 99466 A, B	30-10-1992
		PT 102022 A	29-01-1999
		RO 115446 B	28-02-2000
		SK 44293 A	11-08-1993
		SK 69097 A	05-11-1997
		WO 9208734 A	29-05-1992
		AT 161041 T	15-12-1997
		AU 655156 B	08-12-1994
		AU 6344990 A	03-04-1991
		CA 2064705 A, C	26-02-1991
		DE 69031791 D	22-01-1998
		DE 69031791 T	02-04-1998
		DK 414475 T	09-02-1998
		EP 0414475 A	27-02-1991
		ES 2110411 T	16-02-1998
		GR 3026114 T	29-05-1998
		JP 5502156 T	22-04-1993
		PT 95093 A, B	22-05-1991
		WO 9102820 A	07-03-1991
		AU 638719 B	08-07-1993
		AU 5812390 A	18-12-1990
		BG 60348 B	30-06-1994
		CA 2017157 A	18-11-1990
		EP 0398748 A	22-11-1990
		FI 105279 B	14-07-2000
		HU 59964 A	28-07-1992
		JP 10113176 A	06-05-1998
		JP 10000089 A	06-01-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/02202

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 10194988 A	28-07-1998	NONE	

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CIB 7 C12N7/00 C12N5/10 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched (classification system followed by classification symbols)

CIB 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY

ABS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^o	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	US 5 766 919 A (YOSHIKURA HIROSHI ET AL) 16 june 1998 (1998-06-16) column 5, line 55-column 6, line 5 column 4, line 42-55	20-22, 24
Y	column 2, line 12-column 3, line 5 column 4, line 17-21	1-6, 8-10, 13-15, 17-22
X	WO 94 25064 A (US ARMY) 10 november 1994 (1994-11-10) page 30, line 10-page 31, line 28 page 8, line 25-31	20-22, 24
Y	page 9, line 1-7 page 9, line 20-page 15, line 15 page 15, line 31-page 16, line 21 claims 3-5, 11, 14	1-6, 8-10, 13-15, 17-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.^oSpecial categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the Actual Completion of the International Search

14 december 2000

Date of Mailing of the International Search Report

02/01/2001

Name and mailing address of ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL-2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG., A

Telephone No.

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category ^o	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	MONAZAHIAN MASYAR ET AL: "Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY MARCH, 1999, vol. 57, no. 3, march 1999 (1999-03), pages 223-229, XP000864507 ISSN: 0146-6615 page 225, left column, last paragraph-page 226, left column, paragraph 2; figure 2	23,,24
X	US 5 679 342 A (WEINER AMY J ET AL) 21 october 1997 (1997-10-21) column 18, line 11-column 20, line 54 column 13, line 41-50	17,18 20-22,24
A		7
X	BUCCI CECILIA ET AL: "Free fatty acids modulate LDL receptor activity in BHK-21 cells." ATHEROSCLEROSIS APRIL, 1998, vol. 137, no. 2, april 1998 (1998-04), pages 329-340, XP000864506 ISSN: 0021-9150 page 334, left column-page 336, right column figures 4,7	16
X	KITA T ET AL: "ANTIBODY AGAINST LOW DENSITY LIPO PROTEIN RECEPTOR BLOCKS UPTAKE OF LOW DENSITY LIPO PROTEIN BUT NOT HIGH DENSITY LIPO PROTEIN BY THE ADRENAL GLAND OF THE MOUSE IN-VIVO" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1981, vol. 256, no. 10, 1981, pages 4701-4703, XP000864537 ISSN: 0021-9258 figures 2,3	23
X	EDWARDS E H ET AL: "CASTANOSPERMINE INHIBITS THE FUNCTION OF THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR" BIOCHEMISTRY 1989, vol. 28, no.19, 1989, pages 7679-7687, XP000891868 ISSN: 0006-2960 page 7683, left column, paragraph 3 -page 7684, left column, paragraph 1; figures 2,3	23

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category ^o	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	SEIPP STEFANIE ET AL: Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 1997, vol. 78, no. 10, 1997, pages 2467-2476, XP002136094 ISSN: 0022-1317 the entire document	1-24
X	YEN FRANCIS T ET AL. "Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein." BIOCHEMISTRY 1994, vol. 33, no. 5, 1994, pages 1172-1180, XP000891746 ISSN: 0006-2960 page 1174, left column, paragraph 1 figure 1	16
A		3
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199840 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1998-462789 XP002136096 & JP 10 194988 A (SUMITOMO SEIYAKU KK), 28 july 1998 (1998-07-28) abstract	8,9
P,X	AGNELLO VINCENT ET AL: "Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA OCT. 26, 1999, vol. 96, no. 22, 26 october 1999 (1999-10-26), pages 12766-12771, XP002136095 ISSN: 0027-8424 page 12678, left column, last paragraph-right column, paragraph 2; figure 3 page 12768, left column, paragraph 4; table 2	1,6,10 14,15 23,24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information Relative to Members of Patent Families

International Application No.
PCT/FR 00/02202

Patent Document Cited in Search Report			Publication Date	Member(s) of Patent Family			Publication Date
US	5766919	A	16-06-1998	JP	534489	A	27-12-1993
				JP	6125799	A	10-05-1994
				EP	0611393	A	24-08-1994
				WO	9325662	A	23-12-1993
				US	5552310	A	03-09-1996
<hr/>							
WO	9425064	A	10-11-1994	AU	6943994	A	21-11-1994
<hr/>							
US	5679342	A	21-10-1997	US	5968775	A	19-10-1999
				AT	188220	T	15-01-2000
				AU	668078	B	26-04-1996
				AU	9026791	A	11-06-1992
				CA	2095521	A	09-05-1992
				CA	2203443	A	09-05-1992
				CZ	9300824	A	13-04-1994
				DE	69131882	D	03-02-2000
				DE	69131882	T	04-05-2000
				DK	556292	T	17-04-2000
				EP	0556292	A	25-08-1993
				EP	0842947	A	20-05-1998
				ES	2139591	T	16-02-2000
				FI	932025	A	07-06-1993
				FI	971702	A	21-04-1997
				GR	3032771	T	30-06-2000
				HU	66063	A	28-09-1994
				JP	11071395	A	16-03-1999
				JP	6504431	T	26-05-1994
				NO	931680	A	28-06-1993
				NO	972213	A	14-05-1997
				PT	99466	A,B	30-10-1992
				PT	102022	A	29-01-1999
				RO	115446	B	28-02-2000
				SK	44293	A	11-08-1993
				SK	69097	A	05-11-1997
				WO	9208734	A	29-05-1992
				AT	161041	T	15-12-1997
				AU	655156	B	08-12-1994
				AU	6344990	A	03-04-1991
				CA	2064705	A,C	26-02-1991
				DE	69031791	D	22-01-1998
				DE	69031791	T	02-04-1998
				DK	414475	T	09-02-1998
				EP	0414475	A	27-02-1991
				ES	2110411	T	16-02-1998
				GR	3026114	T	29-05-1998
				JP	5502156	T	22-04-1993
				PT	95093	A,B	22-05-1991
				WO	9102820	A	07-03-1991
				AU	638719	B	08-07-1993
				AU	5812390	A	18-12-1990
				BG	60348	B	30-06-1994
				CA	2017157	A	18-11-1990
				EP	0398748	A	22-11-1990
				FI	105279	B	14-07-2000
				HU	59964	A	28-07-1992
				JP	10113176	A	06-05-1998
				JP	10000089	A	06-01-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information Relative to Members of Patent Families

International Application No.
PCT/FR 00/02202

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Member(s) of Patent Family	Publication Date
JP 10194988 A	28-07-1998	NONE	

PCT**REQUEST**

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No. R00/02202

International Filing Date July 31, 2000

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) MD/B05B3441**Box No. I TITLE OF INVENTION**

METHOD FOR IN VITRO CULTURE OF VIRUSES OF THE TOGAVIRIDAE OR FLAVIVIRIDAE FAMILIES AND USES

Box No. II APPLICANT☐

This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

BIO MERIEUX
Chemin de l'Orme
F-69280 Marcy L'Etoile
France

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

France

State (that is, country) of residence:

France

This person is applicant
for the purposes of:☐all designated
States☒all designated States except the
United States of America☐the United States
of America only☐the States indicated in the
Supplemental Box**Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Institut National De La Sante Et De La Recherche Medicale
101 Rue de Tolbiac
F-75654 Cedex 13 Paris
France

This person is:

☒

applicant only

☐

applicant and inventor

☐inventor only (If this check-box is
marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

France

State (that is, country) of residence:

France

This person is applicant for
the purposes of:☐all designated
States☒all designated States except
the United States of America☐the United States
of America only☐the States indicated in the
Supplemental Box☒

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒

agent

☐

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Germain & Maureau
BP 6153
F-69466 Cedex 06 Lyon
FRANCE

Telephone No.

04 72 69 84 30

Facsimile No.

04 72 69 84 31

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

ANDRE, Patrice
6 Rue Victor Basch
F-35700 Rennes
France

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
France

State (that is, country) of residence:
France

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LOTTEAU, Vincent
Le Bourg
F-71460 Vaux En Pre
France

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
France

State (that is, country) of residence:
France

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

PARANHOS-BACCALA, Glaucia
75 Cours Gambetta
F-69003 Lyon
France

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
France

State (that is, country) of residence:
France

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KOMURIAN-PRADEL, Florence
114 Chemin du Pavillon
F-69250 Poleymieux
France

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
France

State (that is, country) of residence:
France

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES

Mark the applicable check-boxes at least one must be marked.

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a): (Double-click here if you want all the boxes below checked.)

Regional Patent

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line).....

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | | |
|--|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda | <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> MZ Mozambique |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| | <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize | Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH & LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> CO Colombia | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania | |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg | <input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algeria | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America .. |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | Republic of Macedonia | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa |
| | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 07-30-1999	99 10095	France		
item (2)				
item (3)				
item (4)				
item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☐ all items
 ☒ item (1)
 ☐ item (2)
 ☐ item (3)
 ☐ item (4)
 ☐ item (5)
 ☐ other, see Supplemental Box

*Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA /EP.....

Request to use results of earlier search: reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

Number of
declarations

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (i) | Declaration as to the identify of the inventor | : |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (ii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent | : |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application | : |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iv) | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) | : |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (v) | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty: | : |

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) the following number of sheets in paper form:

request (including declaration sheets)

: 5

description (excluding sequence listing part)

: 24

claims : 5

abstract : 1

drawings : 1

Sub-total number of sheets : 36sequence listing part of description (*actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below*) : _____**Total number of sheets** : 36

(b) sequence listing part of description filed in computer readable form

(i) ☐ only (under Section 801(a)(i))(ii) ☐ in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(ii))**Type and number of carriers** (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which the sequence listing part is contained (*additional copies to be indicated under item 9(ii), in right column*):

This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):

Number of items

1. ☒ fee calculation sheet : _____
2. ☐ original separate power of attorney : _____
3. ☐ original general power of attorney : _____
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: _____
5. ☐ statement explaining lack of signature : _____
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): _____
7. ☐ translation of international application into (language): _____
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material : _____
9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other)) : _____
 - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) : _____
 - (ii) ☐ (*only where check-box (b)(i) or (b)(ii) is marked in left column*) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter : _____
 - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column : _____
10. ☐ other (*specify*) _____

Figure of the drawings which should accompany the abstract:**Language of filing of the international application:** French**Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE***Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).*GERMAIN & MAUREAU
Mireille DIDIER

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /EP	
6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 février 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/09289 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 7/00,
5/10, 5/06

L'Etoile (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101,
rue de Tolbiac, F-75654 Cedex 13 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02202

(22) Date de dépôt international: 31 juillet 2000 (31.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/10095 30 juillet 1999 (30.07.1999) FR

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): ANDRE,
Patrice [FR/FR]; 6, rue Victor Basch, F-35700 Rennes
(FR). LOTTEAU, Vincent [FR/FR]; Le Bourg, F-71460
Vaux en Pré (FR). PARANHOS-BACCALA, Glaucia
[FR/FR]; 75, cours Gambetta, F-69003 Lyon (FR). KO-
MURIAN-PRADEL, Florence [FR/FR]; 114, chemin du
Pavillon, F-69250 Poleymieux (FR).

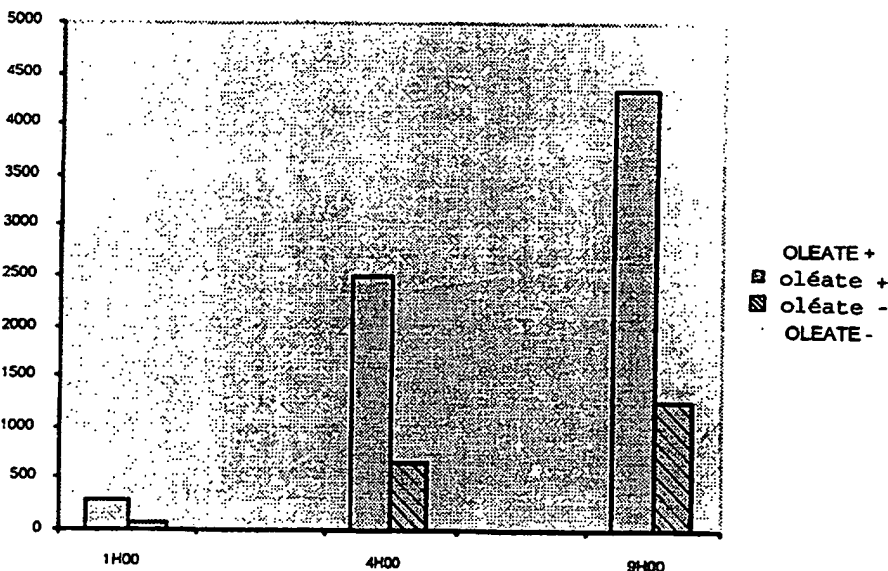
(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US): BIO
MERIEUX [FR/FR]; Chemin De L'Orme, F-69280 Marcy

(74) Mandataire: GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale
6153, F-69466 Cedex 06 Lyon (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR IN VITRO CULTURE OF VIRUSES OF THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE FAMILY AND
USES

(54) Titre: PROCEDE DE CULTURE IN VITRO DE VIRUS DES FAMILLES TOGAVIRIDAE ET FLAVIVIRIDAE ET APPLI-
CATIONS



(57) Abstract: The invention concerns a method of culturing, propagating and replicating in vitro viruses of the *Togaviridae* and *Flaviviridae* families which consists in: providing at least a fraction of LVP's obtained from serum or plasma of a patient infected with at least a virus of the *Togaviridae* and *Flaviviridae* families; contacting said fraction, for a predetermined time interval in an appropriate culture medium, with permissive cells having an endocytosis path relayed by at least one receptor of the lipoproteins and modulated inter alia by an activating agent selected among an unsaturated fatty acid or an unsaturated fatty acid derivative comprising 16 to 20 carbon atoms or their mixture. The invention also concerns the uses of viral particles and polypeptides obtained by said method.

[Suite sur la page suivante]

WO 01/09289 A1



(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé: Selon le procédé de culture, de propagation et de répllication *in vitro* de virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*, on dispose d'au moins une fraction de LVPs obtenue à partir de sérum ou de plasma d'un patient infecté par au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*, on met en contact ladite fraction, pendant un temps prédéterminé dans un milieu de culture approprié, avec des cellules permissives qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines et modulée entre autres par un agent activateur choisi parmi un acide gras insaturé ou un dérivé d'un acide gras insaturé comprenant de 16 à 20 atomes de carbone ou leur mélange. L'invention concerne aussi les applications des particules virales et polypeptides obtenus selon le procédé précité.

Procédé de culture in vitro de virus des familles
Togaviridae et Flaviviridae et applications

La présente invention a notamment pour objet un
5 procédé de culture et de propagation in vitro d'un virus à
ARN impliqué dans le développement de pathologies humaines
virales.

Le procédé de culture et de propagation de
l'invention s'applique principalement aux virus
10 appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*.
Ces virus présentent les caractéristiques communes d'être
des virus enveloppés à ARN simple brin positif-sens, non
segmenté.

~~La famille des *Togaviridae* comprend les virus des~~
15 genres *Alphavirus* et *Rubivirus*. Les virions ont un
diamètre de 70 nm, sont sphériques et comportent une
enveloppe et des péplomères composés d'un hétérodimère de
deux glycoprotéines. Le génome consiste en une molécule
unique d'ARN simple brin de 9,7 à 11,8 kb. Les protéines
20 structurales incluent une protéine de la capside et deux
glycoprotéines d'enveloppe. Les virions contiennent des
lipides dérivés des membranes cellulaires de l'hôte. La
réplication implique la synthèse d'un brin d'ARN
complémentaire, qui sert de matrice pour la synthèse de
25 l'ARN génomique. L'ARN génomique sert de matrice à un ARN
intermédiaire de réplication, qui à son tour sert de
matrice pour la synthèse d'ARNm et la production d'un
précurseur polyprotéique qui est clivé pour l'obtention
des protéines structurales et non structurales. La
30 réplication a lieu dans le cytoplasme et l'assemblage
implique un bourgeonnement au travers la membrane.

Le virus Sindbis, les virus des encéphalites équine
(de l'est, de l'ouest, vénézuélienne), le virus
chikungunya, le virus o'nyong-nyong, le virus Igbo Ora, le
35 virus Ross River, le virus Mayaro et le virus Barmah
Forest appartiennent au genre des *Alphavirus* et sont des

agents pathogènes pour l'homme. Le virus de l'hépatite E est actuellement classé dans le groupe des *Alphavirus*, bien qu'il soit non enveloppé et de plus petite taille. Le virus de la rubéole qui est classé dans le genre des *Rubivirus* est également un agent pathogène pour l'être humain.

Dans la famille des *Flaviviridae* sont classés les virus des genres *Flavivirus* (*flavivirus*), *Pestivirus* (virus des maladies des muqueuses) et *Hepacivirus* (virus des hépatites C et G). Les virions sont sphériques avec un diamètre de 45 à 60 nm de diamètre et sont constitués d'une bi-couche lipidique enveloppant une capsid

icosaédrique enfermant le génome. Le génome consiste en une molécule unique d'ARN linéaire simple brin, positif-sens de 10,7 kb pour les *flavivirus*, 12,5 kb pour les *pestivirus* et 9,5 kb pour le virus de l'hépatite C. Les virions contiennent deux ou trois protéines associées à la membrane et une protéine core. Les virions contiennent des lipides dérivés des membranes cellulaires de l'hôte. Ils contiennent des carbohydrates sous la forme de glycolipides et de glycoprotéines. La réplication implique la synthèse d'un ARN complémentaire qui sert de matrice pour la synthèse de l'ARN génomique. Une trame de lecture unique (ORF) code pour une polyprotéine qui est clivée par protéolyse virale et cellulaire. Les protéines structurales sont codées par l'extrémité 5' et les protéines non structurales sont codées par l'extrémité 3' de l'ARN. La réplication a lieu dans le cytoplasme et l'assemblage implique le passage et l'enveloppement par les membranes du réticulum endoplasmique de l'hôte. La réplication est accompagnée par un aspect caractéristique de prolifération des membranes intracellulaires.

Le virus de la fièvre jaune, le virus de la dengue, le virus de l'encéphalite japonaise, le virus de West Nile, le virus de l'encéphalite de St Louis, le virus de la Vallée de Murray, les virus de l'encéphalite transmise

par les tiques et le virus de la méningoencéphalite de la dinde d'Israël appartiennent au genre des *Flavivirus* et sont des agents pathogènes pour l'homme.

Le virus de la diarrhée bovine, le virus du choléra
5 du porc et le virus « border disease » du mouton appartiennent au genre des *Pestivirus*.

Quant au genre *Hepacivirus*, il regroupe actuellement les virus de l'hépatite C et de l'hépatite G (GBV-C et les virus GBV-A et GBV-B) qui sont bien connus pour être des
10 agents infectant l'homme.

En effet, l'hépatite C est la cause principale des hépatites acquises par transfusion. L'hépatite C peut également être transmise par d'autres voies percutanées,
~~par exemple par injection de drogues par voie~~
15 intraveineuse. Le risque de contamination des professionnels de la santé n'est par ailleurs pas négligeable.

L'hépatite C se distingue des autres formes de maladies du foie associées à des virus, telles que les
20 hépatites A, B ou D. Les infections par le virus de l'hépatite C (HCV ou VHC) sont souvent chroniques avec pour résultante des maladies du foie, telles que hépatite, cirrhose et carcinome dans un grand nombre de cas.

Bien que le risque de transmission du virus par transfusion ait diminué du fait de la sélection des
25 donneurs de sang, la fréquence des hépatites C reste élevée. Actuellement, environ 170 millions de personnes à travers le monde sont infectées de manière chronique par HCV. Les populations à risque élevé se trouvent
30 principalement chez les transfusés et les utilisateurs de drogues intraveineuses, mais il existe des donneurs de sang asymptomatiques qui n'appartiennent pas à ces groupes à risque élevé et chez lesquels des anticorps anti-HCV circulants ont été retrouvés. Pour ces derniers, la voie
35 de l'infection n'a encore pas été identifiée.

HCV a été le premier virus hépatotrope isolé au moyen des techniques de biologie moléculaire. Les séquences du génome viral ont été clonées avant que la particule virale ait été visualisée.

5 HCV est un virus à ARN simple brin positif, de 9,5 kb, qui se réplique par une copie d'ARN complémentaire et dont le produit de la traduction est un précurseur d'une polyprotéine unique d'environ 3 000 acides aminés. L'extrémité 5' du génome de HCV correspond à une région
10 non traduite adjacente aux gènes qui codent pour les protéines structurales, la protéine core de la nucléocapside et les deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2/NS1. La région non traduite 5' et le gène core sont relativement bien conservés dans les différents génotypes,
15 mais les protéines d'enveloppe E2 sont codées par une région hypervariable différente d'un isolat à un autre isolat. L'extrémité 3' du génome de HCV contient les gènes qui codent pour les protéines non structurales (NS) et pour une région 3' non codante bien conservée.

20 Du fait de son organisation génomique et de son mode présumé de réplication, HCV a été classifié dans un nouveau genre de la famille des *Flaviviridae*, les *Hepacivirus*.

De nombreuses techniques ont été développées pour
25 diagnostiquer une infection par HCV. Par exemple, des essais immunologiques de diagnostic ont été réalisés pour détecter des anticorps dirigés contre des protéines de HCV dans les sérums de patients. La synthèse d'ADNc par transcription inverse de l'ARN viral et l'amplification
30 par PCR ont également été utilisées pour détecter le génome de HCV, comme la mesure indirecte d'un virus potentiellement infectieux dans les sérums d'humains infectés de manière chronique ou ceux de chimpanzés infectés expérimentalement. Par ailleurs, sur la base du
35 clonage de gènes, des techniques d'hybridation avec une sonde ADN ont également été développées.

Cependant, il est reconnu que les techniques de diagnostic existantes manquent de sensibilité et/ou de spécificité et/ou souffrent de difficultés de mise en oeuvre. A titre d'exemple, avec la méthode d'hybridation de sondes il est impossible de faire la distinction entre un virus à faible pouvoir infectieux et un virus à pouvoir infectieux élevé. Il est donc nécessaire, mais difficile à mettre en oeuvre, d'inoculer le virus devant être testé à un chimpanzé et de tester l'infection résultante sur l'animal.

Il est donc de toute première importance, d'un point de vue de santé publique, de pouvoir développer des méthodes spécifiques, sensibles et pratiques pour identifier et cribler les porteurs de HCV. Une des solutions pourrait être de réaliser un système de culture *in vitro* très efficace de HCV qui permettrait d'obtenir une propagation du virus, en particulier pour étudier ses mécanismes de réplication, pour tester des anticorps neutralisants ou des antiviraux, de même que pour développer des matériaux biologiques, des essais de diagnostic et des préparations vaccinales. En effet, bien que la séquence complète de HCV soit disponible depuis 1989 (Q. L Choo et al., Science 244, 359 (1989)), la compréhension du cycle de vie et du mode de réplication d'HCV a été entravée par manque d'un système de culture *in vitro* approprié. Ito et al. (J. Gen. Virol. 77 : 1043-1054 (1996)) ont bien confirmé le maintien de la réplication de HCV dans des cultures primaires d'hépatocytes humains, obtenus à partir de patients porteurs de HCV et pour lesquels la maladie était établie de manière chronique, et suggéré un passage d'infection, mais des problèmes relatifs à la propagation du virus subsistent (impossibilité de culture au long cours) et le système développé est limité par la nécessité d'approvisionnement en foie humain et la lourdeur de la technique. Par ailleurs, à ce jour, il n'y a pas de consensus général sur

le tropisme de HCV et tous les récepteurs cellulaires pour le virus n'ont pas encore été identifiés, notamment les récepteurs permettant l'endocytose du virus (Pileri et al., 1998, Science, 282, pages 938-941).

5 HGV est un virus qui a été découvert de manière indépendante par deux équipes différentes, l'une l'a appelé HGV et l'autre GBV-C. Il possède une structure génomique proche de celle des flavivirus. Sa polyprotéine de 2 900 acides aminés est codée par un ARN de 9 400
10 nucléotides dont l'extrémité 5' code pour des protéines structurales (nucléocapside tronquée et enveloppe) et l'extrémité 3' code pour des protéines qui ont un rôle dans la réplication. Il est transmis par transfusion sanguine et peut être détecté chez des patients qui
15 présentent des hépatites aiguës, chroniques et fulminantes. Sa contribution dans des maladies du foie aiguë et chronique est encore mal connue. GBV-A et GBV-B ont également été décrits et sont très proches de HGV.

Dans le plasma de patients infectés par HCV sont
20 retrouvées des particules contenant de l'ARN viral très hétérogènes en densité. Cette hétérogénéité de densité des particules contenant de l'ARN viral est attribuée à leur association en proportion variable avec des lipoprotéines (Thomsen et al., 1993, Med. Microbiol. Immunol. 182 :
25 639). Dans la description de la présente demande de brevet, les inventeurs ont dénommé ces particules hybrides LVPs (lipo-viro-particules). La répartition de chacune de ces formes le long d'un gradient de densité varie d'un patient à l'autre. Les analyses existantes des particules
30 de faible densité montrent des densités recouvrant celles des LDLs (Low Density Lipoproteins) et des VLDLs (Very Low Density Lipoproteins). La taille décrite (50 nm) les rapprochent des VLDLs. Par ailleurs, les particules peuvent être précipitées, parfois même dans leur totalité,
35 par des sérums anti- β -lipoprotéines (Thomsen et al., 1992,

Med. Microbiol. Immunol. 181 : 293 ; Prince et al., 1996, J. Viral. Hepat. 3 : 11).

Il a également été observé que le virus de l'hépatite G peut être précipité, en quasi-totalité, par des sérums
5 anti- β -lipoprotéines obtenus à partir de patients chroniquement infectés par HGV (Sato et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 229 :719).

Il a par ailleurs été observé que l'infection par HCV d'hépatocytes humains s'accompagne d'une accumulation
10 intracytoplasmique de vésicules lipidiques. La transfection du gène de HCV codant pour la capsid dans une lignée continue d'hépatocytes humains (Hep/G2) induit le même phénomène (Barba et al., 1997, PNAS 94 :1200). Ces
vésicules sont riches en triglycérides. La protéine de
15 capsid de HCV est accolée à la surface des vésicules, de même que l'apolipoprotéine apo A-II.

Les apolipoprotéines permettent le transport des lipides en apportant une stabilité structurelle et une solubilité aux particules lipoprotéiques auxquelles elles
20 sont associées. Elles déterminent aussi le sort de ces particules dans le métabolisme, notamment en les ciblant sur des récepteurs.

Apo B 100 est l'apolipoprotéine principale des VLDLs, LDLs et IDLs (Intermediate Density Lipoproteins). Elle est
25 synthétisée dans le foie et est essentielle pour l'assemblage et la sécrétion des VLDLs à partir du foie. Elle constitue également un ligand pour la liaison des LDLs à leurs récepteurs. Un des récepteurs des LDLs, le LDL-récepteur, est une protéine de surface des cellules
30 qui lie et internalise les lipoprotéines riches en cholestérol qui contiennent apo B 100 et apo E. Apo E est principalement synthétisée dans les hépatocytes. Elle constitue un ligand pour la liaison de différentes lipoprotéines au récepteur des LDLs et au LRP (LDL-
35 receptor-related protein).

Apo B 48 est essentielle pour l'assemblage et la sécrétion des chylomicrons. Elle est codée par le même gène et le même ARNm que apo B 100, mais dans l'intestin une mutation introduit un codon stop de sorte que apo B 48
5 contient seulement 48% de la longueur totale de apo B 100. Son rôle dans le métabolisme des chylomicrons dans le plasma est mal connu, mais les individus qui présentent des mutations qui interfèrent avec sa synthèse normale n'ont pas, ou des niveaux très faibles, de chylomicrons,
10 VLDLs, IDLs et LDLs.

La nature des LVPs précitées contenant de l'ARN viral n'est à ce jour pas connue, mais les présents inventeurs ont émis l'hypothèse et vérifié qu'au moins un des récepteurs de surface cellulaire des lipoprotéines
15 participe à l'infection et la propagation des virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* dans une culture cellulaire. Ils ont en effet montré que les LVPs sont des ligands pour une voie d'endocytose associée à des récepteurs, préférentiellement pour le LSR
20 (Lipolysis-Stimulated Receptor) (Frances T. Yen et al., *Biochemistry*, 1994, 33, 1172-1180 et Bernard E. Bihain and Frances T. Yen, *Biochemistry*, 1992, 31, 4628-4636). Ils ont par ailleurs montré que les LVPs peuvent être associées à des immunoglobulines humaines.

25 Sur cette base, ils ont développés de nouveaux procédés qui permettent la culture, la propagation et la répllication *in vitro* de virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*. Ces procédés, qui permettent d'obtenir une propagation de ces virus, sont utiles
30 notamment pour étudier leurs mécanismes de répllication, pour tester des anticorps neutralisants et des antiviraux, pour développer des matériaux biologiques pour le diagnostic et la thérapie. Par ailleurs, les procédés de l'invention permettent d'obtenir une lignée cellulaire
35 infectée utile pour cribler et/ou sélectionner au moins

une molécule anti-virale, par mise en contact de la lignée cellulaire infectée et de la molécule anti-virale.

Selon ce procédé, on dispose d'au moins une fraction de LVPs ou d'au moins une fraction de LVPs associée à des immunoglobulines humaines, obtenue à partir de sérum ou de plasma d'un patient infecté par un virus appartenant à la famille des *Togaviridae* ou *Flaviviridae*, on met en contact, pendant un temps prédéterminé dans un milieu de culture approprié, ladite fraction de LVPs avec des cellules permissives qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines et modulée par un agent activateur, choisi parmi les acides gras insaturés, les dérivés d'acides gras insaturés comprenant de 16 à 20 atomes de carbone et leurs mélanges.

Le récepteur des lipoprotéines est le LSR et/ou le récepteur de surface des LDLs et avantageusement lesdites cellules permissives possèdent les deux récepteurs.

L'acide gras insaturé est choisi parmi l'acide oléique, l'acide palmitoléique, l'acide linoléique, l'acide linolénique, l'acide arachidonique, l'acide trans-hexadécénoïque et l'acide elaïdique ou leurs dérivés. Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'acide gras retenu est l'acide oléique qui est ajouté au milieu de culture à une concentration comprise entre 0,1 et 1 mM, de préférence 0,5 mM.

Les cellules sont de préférence des cellules choisies parmi les cellules d'hépatocytes humains ou animaux, le groupe des lignées cellulaires d'hépatocarcinome humain ou animal, les cellules dendritiques, les cellules macrophagiques, les cellules de Kuppfer et leurs combinaisons associées ou non à des lymphocytes. Avantageusement, ces cellules sont des cellules d'hépatocarcinome humain de la lignée cellulaire PLC/PRF/5.

Préférentiellement, le milieu de culture comprend outre les ingrédients nécessaires à la culture et l'agent

activateur, au moins un agent modulateur de l'apoptose. Cet agent modulateur de l'apoptose est choisi parmi les interférons, les anti-interférons, en particulier les anti-interférons alpha et beta, les anti-caspase 3, en particulier des analogues peptidiques, tels que le z-VADfmk, c'est à dire le N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluorométhylcétone, et les anticorps dirigés contre les anti-caspase 3.

En effet, les présents inventeurs ont observé que chez des patients infectés à la fois par HIV et par l'Hepacivirus HCV, la prise de certains inhibiteurs de la protéase du HIV, tels que le Ritonavir (nom commercial) entraîne une augmentation de la virémie HCV associée à la cytolyse hépatique. L'observation d'une cytolyse hépatique aussitôt après la prise d'un médicament qui, en plus de son activité anti-protéasique, modifie également la régulation de l'apoptose est évocatrice d'une induction du signal d'apoptose. C'est pourquoi, il est intéressant d'ajouter dans le procédé de l'invention au moins un agent modulateur de l'apoptose.

Le milieu approprié retenu est en particulier choisi parmi le milieu DMEM ou un milieu dérivé du milieu DMEM et milieu RPMI ou un milieu dérivé du milieu RPMI. De préférence, c'est un milieu dérivé du milieu DMEM qui comprend le milieu DMEM complet commercialisé par la société Gibco BRL, complémenté par 0 à 10 mM de pyruvate de sodium, 0 à 10 % d'acides aminés non essentiels, 1 à 10 mM de glutamine, 100 à 200 U/ml de pénicilline, 100 à 200 mg/ml de streptomycine et 1 à 20 % de sérum de veau.

Ce milieu avantageusement comprend de plus 0,1 à 0,5% de BSA (Albumine Sérique de Bovin) ou de HSA (Albumine Sérique Humaine) couplée à un acide gras, selon la méthode de Dixon et al., 1991, Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p 5080.

Dans un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, préalablement à la mise en contact des

cellules permissives avec la fraction de LVPs, les cellules permissives sont lavées dans un tampon PBS préchauffé à une température d'environ 37°C.

On réalise plusieurs passages des cellules permissives ainsi infectées dans les conditions décrites ci-dessus et on met en évidence la présence dudit virus dans les cellules permissives infectées et dans le surnageant de culture par RT-PCR et/ou par une technique immunologique, telle que immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps spécifique dudit virus et/ou par cytométrie de flux.

Le procédé de culture, de propagation et de répllication décrit précédemment est particulièrement bien adapté à la culture, la propagation et la répllication des virus appartenant à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Hepacivirus*, en particulier les virus de l'hépatite C et de l'hépatite G, incluant les virus GBV-A, GBV-B et GBV-C, pour lesquels il n'existait pas à ce jour de procédé de culture efficace.

L'invention a également pour objet un milieu de culture pour la culture de virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*, lequel milieu comprend le milieu DMEM complet commercialisé par la société Gibco BRL, complémenté par 0 à 10 mM de pyruvate de sodium, 0 à 10 % d'acides aminés non essentiels, 1 à 10 mM de glutamine, 100 à 200 U/ml de pénicilline, 100 à 200 mg/ml de streptomycine et 1 à 20 % de sérum de veau. Ce milieu avantageusement comprend de plus 0,1 à 0,5% de BSA (Albumine Sérique de Bovin) ou de HSA (Albumine Sérique Humaine), couplée à un acide gras, selon la méthode citée en référence ci dessus.

L'invention a aussi pour objet une lignée cellulaire infectée par au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*, dans laquelle les cellules dans la lignée cellulaire sont des cellules permissives qui possèdent une voie d'endocytose relayée

par au moins un récepteur des lipoprotéines, susceptible d'être modulée entre autre par un agent activateur, lesdites cellules étant capables de propager et répliquer le virus. Préférentiellement, le récepteur est le LSR
5 et/ou le récepteur des LDLs et avantageusement les cellules permissives possèdent les deux récepteurs.

En particulier, la lignée cellulaire est une lignée dans laquelle les cellules sont dérivées par infection d'une cellule choisie parmi les cellules primaires
10 d'hépatocytes humains ou animaux, les cellules du groupe des lignées cellulaires d'hépatocarcinome humain et animal, en particulier une cellule provenant de la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain PLC/PRF/5 qui possède
un récepteur de surface des lipoprotéines activable par
15 des acides gras, les cellules denditriques, les cellules macrophagiques et les cellules de Kuppfer. Mais, l'invention n'est pas limitée à une cellule d'une lignée cellulaire qui possède au moins le récepteur de surface LSR des lipoprotéines et englobe les cellules transfectées
20 ou transformées qui sont capables d'exprimer à leur surface le récepteur LSR et/ou le récepteur des LDLs. La lignée cellulaire infectée obtenue selon le procédé de l'invention est utilisable pour cribler et/ou sélectionner au moins une molécule anti-virale selon lequel on met en
25 contact la molécule anti-virale et la lignée cellulaire infectée.

L'invention concerne encore un procédé pour préparer une composition pour la détection dans un échantillon d'anticorps dirigés contre au moins un virus appartenant
30 aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* qui comprend au moins une purification partielle ou totale des particules virales dudit virus ou des polypeptides obtenus à partir d'un des procédés tel que défini précédemment. En particulier, lesdites particules virales ou lesdits
35 polypeptides sont fixés sur un support solide.

Par ailleurs, l'invention concerne un procédé pour l'obtention d'anticorps ou de fragments d'anticorps dirigés contre au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* selon lequel on immunise
5 un animal avec des particules virales ou des polypeptides obtenus à partir d'un des procédés tel que défini précédemment. La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ou de fragments d'anticorps fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut
10 citer à titre d'exemple Köhler G. et Milstein C. (1975) Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256 : 495-497 et Galfre G. et al. (1977) *Nature*, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps polyclonaux et Roda A., Bolelli G.F.
15 Production of high titer antibody to bile acids, *Journal of Steroid Biochemistry*, Vol. 13, pp 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux. Des anticorps peuvent être produits par immunisation de souris ou de lapins avec les particules virales ou les polypeptides
20 obtenus selon le procédé de l'invention. Pour la production d'anticorps monoclonaux, l'immunogène peut être couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole (peptide KLH) comme support pour l'immunisation ou à de l'albumine sérique (peptide SA). Les animaux sont soumis à une
25 injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant complet de Freund. Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests
30 ELISA ou de Western Blot. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide
35 d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quelque soit le mode de production, en

surnameant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou l'immunoprécipitation.

5 Un nombre suffisant d'anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que des anticorps chimères produits par génie génétique est

10 bien connue de l'homme du métier.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)₂, Fab, Fab', sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif

15 et par dérivé on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif (voir par exemple Arakawa et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397).

L'invention concerne aussi une composition

20 diagnostique comprenant au moins les particules virales ou les polypeptides obtenus selon le procédé de l'invention ou les anticorps obtenus selon le procédé défini précédemment et un kit de diagnostic comprenant entre autre ladite composition, ainsi qu'une composition

25 vaccinale comprenant au moins les particules virales ou les polypeptides éventuellement associés à un véhicule et/ou à un excipient et/ou à un adjuvant pharmaceutiquement acceptable. Mais, l'invention ouvre également d'autres perspectives thérapeutiques en ce

30 qu'elle permet de développer une composition thérapeutique susceptible d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative la propagation et la réplication des virus précités *in vivo* parce qu'elle comprend entre autre un ligand susceptible de moduler, de réprimer ou d'inhiber la

35 voie d'endocytose relayée par au moins un des récepteurs des lipoprotéines, le ligand étant choisi parmi un

anticorps antagoniste dirigé contre ledit récepteur dont la production est à la portée de l'homme du métier comme décrit ci-dessus et une protéine non naturelle, c'est à dire une protéine soluble obtenue par recombinaison génétique ou un polypeptide de synthèse soluble se liant audit récepteur ou en ce qu'elle comprend entre autre au moins une molécule qui module, réprime ou inhibe l'expression du gène codant pour ledit récepteur ou l'activité du promoteur du gène qui code pour ledit récepteur.

Enfin, l'invention a pour objet un procédé pour cribler et/ou sélectionner au moins une molécule anti-virale selon lequel on met en contact ladite molécule anti-virale et une lignée cellulaire infectée obtenue selon l'un des procédés de l'invention.

Le terme virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* tel qu'utilisé dans l'invention fait référence à toute espèce virale parmi lesquelles les souches pathogènes pour l'homme, les souches variantes, les souches atténuées et les souches défectives dérivées desdites souches. En effet, il est connu que les virus à ARN présentent un taux de mutations spontanées élevé. Il peut donc exister des souches multiples qui peuvent être plus ou moins virulentes. Il est à la portée de l'homme de l'art d'identifier de telles souches, par exemple par homologie de séquences nucléiques et/ou peptidiques par rapport à une souche de référence et/ou en identifiant une souche ou un isolat par rapport à des critères morphologiques et/ou immunologiques.

Le terme lignée cellulaire fait référence à une culture de cellules permissives dans laquelle le virus se propage après une première culture et comprend donc, mais n'est pas limité, aux cellules individuelles, aux cellules récoltées et aux cultures contenant les cellules dans la mesure où elles sont dérivées de cellules de la lignée cellulaire de référence. Il est connu que des changements

spontanés ou induits peuvent survenir au niveau du caryotype durant le stockage ou le transfert. Donc, les cellules dérivées de la lignée cellulaire de référence peuvent ne pas être strictement identiques aux cellules ou
5 cultures d'origine et la lignée cellulaire fait également référence aux variants. Le terme « lignée cellulaire » inclut également des cellules immortalisées.

Le terme cellules permissives fait référence à toutes cellules qui sont capable de propager le virus, c'est à
10 dire des cellules qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines.

Une composition vaccinale est une composition qui comprend au moins les particules virales ou les polypeptides obtenus selon le procédé de l'invention, mais
15 n'est pas limitée à ceux ci et couvre également les protéines recombinantes et leurs fragments qui peuvent être obtenus par les techniques de recombinaison génétique dans une cellule hôte appropriée. Une telle composition vaccinale peut comprendre, si nécessaire, un véhicule
20 et/ou un excipient et/ou un adjuvant, à la condition qu'ils soient pharmaceutiquement acceptables.

Par « véhicule pharmaceutiquement acceptable » on entend les supports et véhicules administrables à l'être humain ou à un animal, tels que décrits par exemple dans
25 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co. Le véhicule pharmaceutiquement acceptable est de préférence isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse. Les définitions des excipients et adjuvants
30 pharmaceutiquement acceptables sont également données dans Remington's Pharmaceutical Sciences précité.

Exemple 1 : Préparation du matériel biologique.

La séparation des lipoprotéines est effectuée à
35 partir du plasma ou du sérum d'un patient à jeun depuis 12 heures et détecté positif pour le virus de l'hépatite C.

Au sang prélevé du patient est ajouté 1% d'une solution d'EDTA (0,15 M NaCl - 0,1 M EDTA). Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 3500 tpm, à la température de 4°C. Le plasma est ensuite récolté et stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

Le sang du patient est récolté sur tube sec et, après coagulation, centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tpm, à la température de 4°C. Le sérum est prélevé et stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

(i) Obtention d'une fraction comprenant des LVPs d'une densité inférieure à 1,0063 g/ml, d'une fraction comprenant des LVPs d'une densité comprise entre 1,0063 g/ml et 1,063 g/ml, et d'une fraction comprenant des LVPs supérieure à 1,063 g/ml.

Le plasma et le sérum sont respectivement ultracentrifugés pendant 4 heures à 100 000 tpm, à 4°C dans un appareil TL100 commercialisé par la société Beckman et comprenant un rotor TL100.4. La fraction supérieure qui contient les LVPs de densité inférieure à 1,0063 g/ml est récupérée et conservée à 4°C. La fraction inférieure est ajustée à une densité de 1,063 g/ml par addition de 7,21 g de NaBr pour 100 ml de la fraction. La fraction inférieure est ensuite ultracentrifugée pendant 4 heures à 100 000 tpm, à 4°C. dans un appareil TL100 comprenant un rotor TL100.4. La fraction supérieure résultante contenant la fraction d'une densité comprise entre 1,0063 g/ml et 1,063 g/ml est récupérée et conservée à 4°C.

(ii) Obtention d'une fraction comprenant des LVP d'une densité inférieure à 1,025 g/ml, d'une fraction comprenant des LVPs d'une densité comprise entre 1,025 g/ml et 1,063 g/ml, et d'une fraction comprenant des LVP d'une densité supérieure à 1,063 g/ml.

Le plasma et le sérum sont respectivement ajustés à une densité finale de 1,025 g/ml par addition de 2,518 g de NaBr pour 100 ml. Une centrifugation est effectuée

pendant 4 heures à 100 000 tpm, à 4°C sur l'appareil TL100 comprenant un rotor TL100.4.

La fraction supérieure qui contient la fraction d'une densité inférieure à 1,025 g/ml est récupérée et conservée à 4°C. La fraction inférieure est ajustée à une densité de 1,063 g/ml par addition de 4,84 g de NaBr pour 100 ml. La fraction inférieure est ensuite ultracentrifugée pendant 4 heures à 100 000 tpm, à 4°C. dans l'appareil TL100 comprenant un rotor TL100.4. La fraction supérieure résultante contenant les LDLs est récupérée et conservée à 4°C.

Les différentes fractions récoltées sont ensuite dialysées pendant 18 heures à 4°C contre le tampon 0,15 M NaCl/0,24 mM EDTA. Les fractions sont ensuite récupérées et filtrées sur une membrane de 0,45 µ. Un dosage de protéines est effectué par la méthode de Lowry (Sigma).

Exemple 2 : Culture cellulaire.

Le milieu de culture utilisé est le milieu DMEM (commercialisé par Gibco BRL) complémenté avec : 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco), 1% d'acides aminés non essentiels (Boehringer Mannheim), 2 mM de Glutamine (Gibco BRL), 200 U/ml de Penicilline (bioMérieux), 200 mg/ml de Streptomycine (bioMérieux) et 10% de sérum de veau (Boehringer).

Les cellules proviennent de la lignée cellulaire PLC/PRF/5 (Alexander cells) (référence ATCC : CRL 8024) qui est une lignée établie d'un hépatocarcinome humain. Cette lignée, qui a intégré un génome défectif de l'hépatite B, sécrète l'antigène HBs du virus de l'hépatite B mais pas de virus infectieux. Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM complet (Gibco-BRL) complémenté avec 10% de sérum de veau foetal précité. Les cellules sont lavées avec du PBS (Gibco-BRL) préchauffé à 37°C. 1 ml de DMEM complémenté avec 0,2% de BSA (Sigma) et 50 µg/ml de lipoprotéines provenant de chaque fraction ou

100 μ l de sérum filtré sur une membrane de 0,45 μ sont ajout es. Simultanément, une solution d'acide oléique dans de l'isopropanol, pr par e au préalable (100 mM), est ajout e dans une gamme de concentration de 0,1 à 0,8 mM.

5 Les cellules sont ensuite soumises à incubation pendant 3 heures à 37 C sous atmosphère de CO₂ 5%. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu DMEM complet complémenté avec 10% de sérum de veau foetal. Les cellules sont replac es dans l'incubateur dans les conditions décrites

10 précédemment. Les surnageants de culture sont prélevés régulièrement pour une recherche par RT-PCR du génome du virus de l'hépatite C. En parallèle, une analyse par immunofluorescence est r alis e sur les cellules infect es et contr l e à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-

15 protéines structurales HCV.

Exemple 3 : Résultats.

L'étude est r alis e à partir de différentes fractions de LVPs obtenues à partir de plasma de deux

20 patients infectés par HCV. La mise en évidence de la présence du génome HCV dans ces différentes fractions a été r alis es par RT-PCR semi-nich e.

Patient	Fractions LVPs de densité d *:	1er tour	2e tour
Patient n�1	d < 1,0063	+	+
	1,063 < d > 1,0063	-	-
	d > 1,063	-	+
Patient n�2	d < 1,0063	-	+
	1,063 < d > 1,0063	-	+
	d > 1,063	+	+

* : densité d en g / ml

Ces résultats montrent la présence d'un signal positif pour la présence du génome HCV dans les fractions de densité inférieure à 1,0063 g/ml, chez les deux patients soit au premier tour de PCR, soit au deuxième
5 tour de PCR.

L'analyse de la fraction de densité comprise entre 1,063 et 1,0063 g/ml, est négative pour la présence du génome HCV chez les patients n°1, mais positive au deuxième tour de PCR chez le patient n°2. La fraction de
10 densité supérieure à 1,063 g/ml est positive pour la présence du génome HCV chez les deux patients, mais la réponse est plus faible pour le patient 1 que pour le patient 2. Ces différences entre le patient n°1 et le
patient n°2 au niveau de la fraction de densité comprise
15 entre 1,063 et 1,0063 g/ml, peuvent s'expliquer par une charge virale plus faible chez le patient n°1.

Des résultats ont été obtenus à partir de surnageants de culture après infection de 100 µl de sérum prélevés chez les patients n°1 et n°2 en présence ou non d'acide
20 oléique 0,5 mM. Des contrôles négatifs ont été réalisés dans les mêmes conditions. L'analyse effectuée par RT-PCR semi-nichée, montre que pour les deux patients, la présence du génome HCV dans les surnageants de culture est détectée à une fréquence plus élevée dans les essais pour
25 lesquels l'infection a été réalisée en présence d'oléate.

Des essais similaires, réalisés à partir des fractions de densités différentes (inférieure à 1,0063 g/ml, comprise entre 1,0063 g/ml et 1,063 g/ml et
supérieure à 1,063 g/ml), confirment ces résultats et
30 montrent que l'acide oléique facilite la voie d'endocytose des LVPs au moment de l'infection.

Exemple 4 : Etude de la cinétique de fixation des LVPs sur le récepteur LSR des hépatocytes en présence ou
35 en absence d'oléate.

Une fraction contenant des LVPs d'une densité comprise entre 1,025 g/ml et 1,055 g/ml a été obtenue à partir d'un sérum HCV positif comme décrit dans l'exemple 1.

5 La quantité de protéines présente dans la fraction LVPs a été déterminée par la méthode de Lowry à l'aide du kit « Protein Assay » (Sigma Diagnostics) et le titre viral a été évalué par quantification de l'ARN de HCV par RT-PCR et détection de la fluorescence en temps
10 réel (LightCycler™, Roche) (Wittwer et al., Biotechniques, 22 : 176-181 (1997)).

La lignée cellulaire PLC/PRF/5, décrite dans l'exemple 2 et cultivée en milieu DMEM-10%SVF, a été
15 utilisée pour l'étude de la fixation des LVPs sur le récepteur LSR en présence ou non d'oléate.

Les résultats ont été obtenus selon le protocole suivant :

Les cellules PLC/PRF/5, ont étéensemencées à 1 million de cellules / puits, de façon à obtenir après 24
20 heures d'incubation à 37°C, 5% CO₂, une confluence d'environ 80%.

Deux lavages en tampon PBS 1X froid ont été réalisés, puis 1 ml de milieu DMEM complet froid contenant 0,2% de BSA est rajouté aux cellules PLC maintenues sur un
25 lit de glace.

La fraction LVPs (soit 10 mg de protéines et 1,7 x10⁶ copies d'ARN d'HCV), est rajoutée aux cellules en présence ou non d'oléate 0,5 mM. Tous les essais ont été réalisés en triplicate.

30 Une incubation a été réalisée à +4°C pendant une durée allant de 1 à 9 heures. Puis, les cellules ont été lavées 3 fois à l'aide de PBS 1X froid, puis lysées avec 0,5 ml de tampon de lyse du kit Rneasy (Qiagen). Les ARNs ont été ensuite purifiés à l'aide de ce même kit et
35 analysés par RT-PCR quantitative (LightCycler™).

Les résultats obtenus sont indiqués dans la figure annexée dans laquelle est représenté en abscisse le temps d'incubation et en ordonné le nombre de copies d'ARN de HCV. Dans la représentation graphique de cette figure, les barres foncées font référence à une culture sans oléate et les barres claires font référence à une culture avec oléate. Les résultats montrent qu'en présence d'oléate, la fixation des LVPs au récepteur LSR est significativement augmentée, par rapport aux essais sans oléate.

Exemple 5 : Mise en évidence de l'association des LVPs à des immunoglobulines humaines.

Différentes fractions contenant des LVPs récoltées à partir de plasma de trois patients infectés par HCV et préparées selon le protocole de l'exemple 1 ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de SDS (Dodecyl Sulfate de Sodium) (SDS-PAGE) (Laemmli, Nature (1970), 227 :680-685). La mise en évidence de la présence d'immunoglobulines (Ig) dans ces fractions a été réalisée par la technique de Western blot (Towbin et al., PNAS, (1979) 76 : 4350-4354), à l'aide d'un sérum de chèvre anti-immunoglobulines humaines couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch laboratories, France). Les résultats montrent que les immunoglobulines humaines sont toujours détectées dans les fractions contenant des LVPs, en quantité différente selon les patients.

La quantité du génome HCV dans ces fractions de LVPs a été mesurée par quantification de l'ARN de HCV par RT-PCR (RT = transcriptase inverse; PCR = polymérase chain reaction) et détection de fluorescence en temps réel (LIGHTCYCLER™, ROCHE) (Wittwer et al., Biotechniques (1997), 22 :176-181). Les résultats montrent que l'ARN de HCV est toujours associé aux fractions contenant des LVPs, en quantité différente selon les patients.

Les LVPs associées aux Ig (LVP/Ig+) ont de plus été purifiées à l'aide de la protéine A couplé à des billes de type MAGmol Protein A MicroBeads Miltenyi Biotec, France) après un passage dans des colonnes MS+ Separation Columns (Miltenyi Biotec, France) ou bien à l'aide de la Protéine A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech, France). Dans ce cas, tout ou majorité de l'ARN-HCV co-purifie avec les Ig, comme illustré dans les tableaux qui suivent. En conséquence, à partir d'une fraction riche en LVPs, les échantillons utilisés pour les infections peuvent être purifiés par l'intermédiaire de leurs Ig de manière à utiliser préférentiellement les LVP/Ig+/ARN+.

15

Patient n°1

	d* < 1,0063	d* 1,063 <d> 1,0063
Présence d'Ig	+++	+++
Quantification d'ARN (pour 0,2ml de LVPs)	27300 copies	33600 copies
Quantification d'ARN co-purifiés avec Ig	23625 copies (86,5%)	31875 copies (94,8%)

d* signifie la densité des LVPs en g/ml.

Patient n°2

	d* < 1,0063	d* 1,063 <d> 1,0063
Présence d'Ig	+++	+/-
Quantification d'ARN (pour 0,2ml de LVP)	32400 copies	235800 copies
Quantification d'ARN co-purifiés avec Ig	21300 copies (65,7%)	21300 copies (9%)

d* signifie la densité des LVPs en g/ml.

20

Patient n°3

	d* < 1,0063	d* 1,025 <d> 1,055
Présence d'Ig	+++	+

Quantification d'ARN (pour 0,2ml de LVP)	197100 copies	45900 copies
Quantification d'ARN co-purifiés avec Ig	142500 copies (72,3%)	26100 copies (56,8%)

d* signifie la densité des LVPs en g/ml.

Ces résultats montrent que lorsque des immunoglobulines sont présentes dans les fractions contenant des LVPs les ARNs viraux sont retrouvés majoritairement dans les fractions de LVPs associées à des immunoglobulines humaines.

REVENDICATIONS

5 1. Procédé de culture, de propagation et de
réplication *in vitro* de virus appartenant aux familles des
Togaviridae et *Flaviviridae*, selon lequel on dispose d'au
moins une fraction de LVPs obtenue à partir de sérum ou de
10 plasma d'un patient infecté par au moins un virus
appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*,
on met en contact ladite fraction, pendant un temps
prédéterminé dans un milieu de culture approprié, avec des
cellules permissives qui possèdent une voie d'endocytose
relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines et
15 modulée par un agent activateur, choisi parmi un acide
gras insaturé ou un dérivé d'un acide gras insaturé
comprenant de 16 à 20 atomes de carbone ou leur mélange.

 2. Procédé de culture, de propagation et de
réplication *in vitro* de virus appartenant aux familles des
20 *Togaviridae* et *Flaviviridae*, selon lequel on dispose d'au
moins une fraction de LVPs, associée à des
immunoglobulines humaines, obtenue à partir de sérum ou de
plasma d'un patient infecté par au moins un virus
appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*,
25 on met en contact ladite fraction, pendant un temps
prédéterminé dans un milieu de culture approprié, avec des
cellules permissives qui possèdent une voie d'endocytose
relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines et
modulée par un agent activateur, choisi parmi un acide
30 gras insaturé ou un dérivé d'un acide gras insaturé
comprenant de 16 à 20 atomes de carbone ou leur mélange.

 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel
le récepteur des lipoprotéines est le LSR et/ou le
récepteur de surface des LDLs.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel l'acide gras insaturé est choisi parmi l'acide oléique, l'acide palmitoléique, l'acide linoléique, l'acide linolénique, l'acide arachidonique, 5 l'acide trans-héxadécénoïque et l'acide elaidique ou leurs dérivés..

5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel l'acide gras est l'acide oléique qui est ajouté audit milieu de culture à une concentration comprise entre 0,1 10 et 1 mM, de préférence 0,5 mM.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les cellules permissives sont des cellules primaires d'hépatocytes humains ou animaux, des cellules choisies dans le groupe des lignées cellulaires 15 d'hépatocarcinome humain ou animal, des cellules denditriques, des cellules macrophagiques, des cellules de Kuppfer et leurs combinaisons associées ou non à des lymphocytes.

7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel les 20 cellules permissives sont des cellules d'hépatocarcinome humain de la lignée cellulaire PLC/PRF/5.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel, le milieu de culture comprend outre les ingrédients nécessaires à la culture et l'acide 25 gras ou le dérivé d'acide gras, un agent modulateur de l'apoptose.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel l'agent modulateur de l'apoptose est choisi parmi les interférons, les anti-interférons, en particulier les 30 anti-interférons alpha ou beta, les anti-caspase 3, en particulier des analogues peptidiques, tels que la zVAD-fmk et les anticorps dirigés contre lesdits anti-caspase 3.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 35 précédentes, dans lequel le milieu est le milieu DMEM ou

un milieu dérivé du milieu DMEM, le milieu RPMI ou un dérivé du milieu RPMI.

11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel le milieu est le milieu DMEM complémenté avec 0 à 10 mM de pyruvate de sodium, 0 à 10 % d'acides aminés non essentiels, 1 à 10 mM de glutamine, 100 à 200 U/ml de pénicilline, 100 à 200 mg/ml de streptomycine et 1 à 20 % de sérum de veau.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel le milieu est avantageusement complémenté avec 0,1 à 0,5 % de BSA ou avec 0,1 à 0,5 % de HSA couplée à un acide gras.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel on effectue après mise en contact des cellules permissives et de ladite fraction de LVPs plusieurs passages desdites cellules permissives ainsi infectées dans des conditions telles que définies selon l'une quelconque des revendications précédentes et on met en évidence la présence dudit virus dans lesdites cellules permissives par RT-PCR et/ou par technique immunologique, telle que par immunofluorescence indirecte notamment à l'aide d'un anticorps spécifique dudit virus et/ou par cytométrie de flux.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le virus appartient à la famille des Flaviviridae et au genre des Hepacivirus.

15. Procédé selon la revendication 14, dans lequel le virus est le virus de l'hépatite C ou le virus de l'hépatite G.

16. Milieu pour la culture, la propagation et la répllication d'au moins un virus appartenant aux familles des Togaviridae et Flaviviridae, ledit milieu étant le milieu DMEM complémenté avec 0 à 10 mM de pyruvate de sodium, 0 à 10 % d'acides aminés non essentiels, 1 à 10 mM de glutamine, 100 à 200 U/ml de pénicilline, 100 à 200 mg/ml de streptomycine et 1 à 20 % de sérum de veau et

avantageusement comprenant de plus 0,1 à 0,5 % de BSA ou HSA couplée à un acide gras.

17. Procédé pour préparer une composition pour la détection dans un échantillon d'anticorps dirigés contre
5 au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* qui comprend au moins une purification partielle ou totale des particules virales dudit virus ou des polypeptides obtenus à partir d'un procédé de culture selon les revendications 1 ou 2.

10 18. Procédé selon la revendication 17, dans lequel lesdites particules virales ou lesdits polypeptides sont fixés sur un support solide.

19. Procédé pour l'obtention d'anticorps ou de fragments d'anticorps dirigés contre au moins un virus
15 appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* selon lequel on immunise un animal avec des particules virales ou des polypeptides obtenus à partir d'un procédé de culture selon les revendications 1 ou 2.

20. Composition diagnostique comprenant au moins les particules virales ou les polypeptides obtenus selon le
20 procédé défini dans l'une quelconque des revendications 17 et 18 ou les anticorps obtenus selon le procédé défini dans la revendication 19.

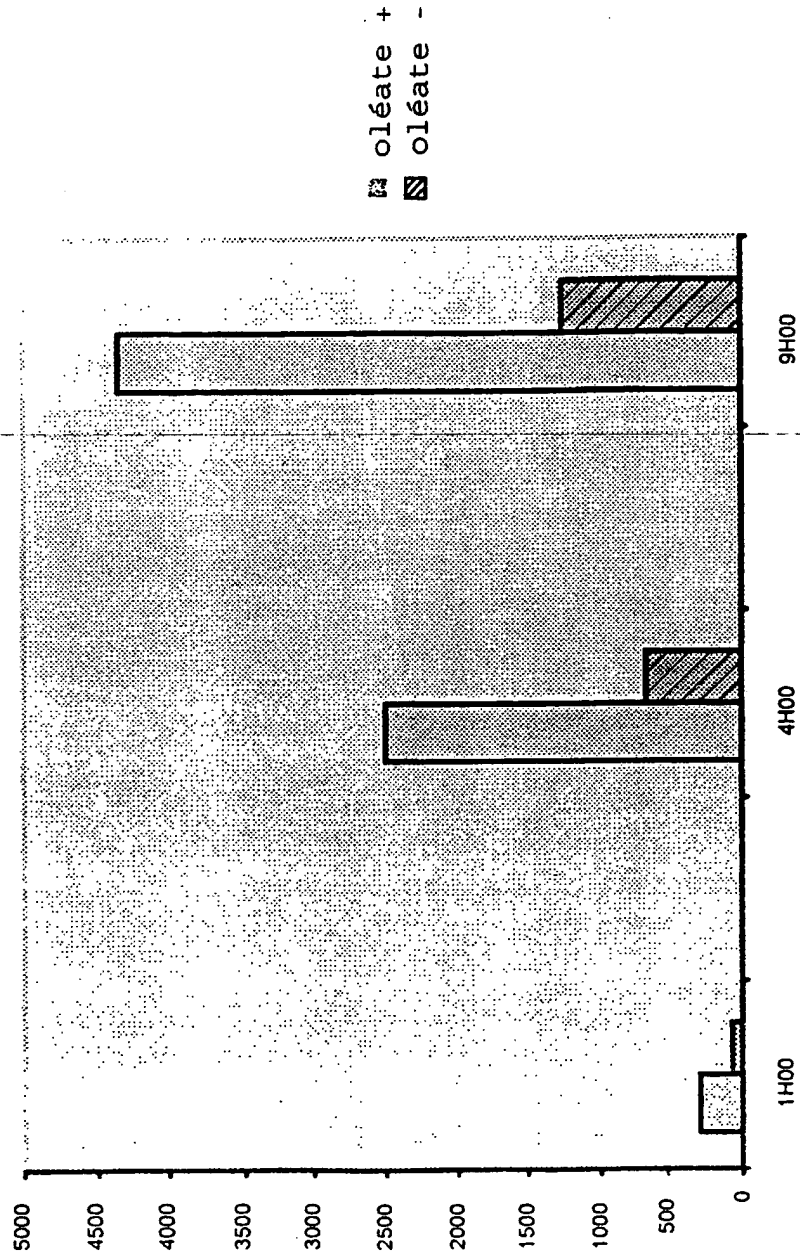
21. Kit de diagnostic comprenant en outre une
25 composition telle que définie dans la revendication 20.

22. Composition vaccinale comprenant au moins les particules virales ou les polypeptides obtenus selon le
procédé défini dans la revendication 17 associé à un véhicule et/ou un excipient et/ou un adjuvant
30 pharmaceutiquement acceptable.

23. Composition thérapeutique susceptible d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative la propagation et la réplication *in vivo* de virus appartenant
aux familles des *Togaviridae* et des *Flaviviridae* qui
35 comprend entre autre un ligand susceptible de moduler, de réprimer ou d'inhiber la voie d'endocytose relayée par au

moins des récepteurs des lipoprotéines, le ligand étant choisi parmi un anticorps antagoniste dirigé contre ledit récepteur et une protéine choisie parmi les protéines recombinantes solubles et les polypeptide de synthèse
5 solubles se liant audit récepteur ou en ce qu'elle comprend entre autre au moins une molécule qui module, réprime ou inhibe l'expression du gène codant pour ledit récepteur ou l'activité du promoteur du gène qui code pour ledit récepteur.

10 24. Procédé pour cribler et/ou sélectionner au moins une molécule anti-virale selon lequel on met en contact ladite molécule anti-virale avec une lignée cellulaire infectée.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 00/02202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N7/00 C12N5/10 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY
ABS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 766 919 A (YOSHIKURA HIROSHI ET AL) 16 June 1998 (1998-06-16) column 5, line 55 - column 6, line 5 column 4, line 42-55	20-22, 24
Y	column 2, line 12 - column 3, line 5 column 4, line 17 - 21	1-6, 8-10, 13-15, 17-22
X	WO 94 25064 A (US ARMY) 10 November 1994 (1994-11-10) page 30, line 10 -page 31, line 28	20-22, 24
Y	page 8, line 25-31 page 9, line 1-7 page 9, line 20 -page 15, line 15 page 15, line 31 -page 16, line 21 claims 3-5, 11, 14	1-6, 8-10, 13-15, 17-22
	--- -/-- ---	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 December 2000

Date of mailing of the international search report

02/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG..., A

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MONAZAHIAN MASYAR ET AL: "Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY MARCH, 1999, vol. 57, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 223-229, XP000864507 ISSN: 0146-6615 page 225, left-hand column, last paragraph -page 226, left-hand column, paragraph 2; figure 2	23,24
X	US 5 679 342 A (WEINER AMY J ET AL) 21 October 1997 (1997-10-21) column 18, line 11 -column 20, line 54 column 13, line 41-50	17,18, 20-22,24
A		7
X	BUCCI CECILIA ET AL: "Free fatty acids modulate LDL receptor activity in BHK-21 cells." ATHEROSCLEROSIS APRIL, 1998, vol. 137, no. 2, April 1998 (1998-04), pages 329-340, XP000864506 ISSN: 0021-9150 page 334, left-hand column -page 336, right-hand column figures 4,7	16
X	KITA T ET AL: "ANTIBODY AGAINST LOW DENSITY LIPO PROTEIN RECEPTOR BLOCKS UPTAKE OF LOW DENSITY LIPO PROTEIN BUT NOT HIGH DENSITY LIPO PROTEIN BY THE ADRENAL GLAND OF THE MOUSE IN-VIVO" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1981, vol. 256, no. 10, 1981, pages 4701-4703, XP000864537 ISSN: 0021-9258 figures 2,3	23
X	EDWARDS E H ET AL: "CASTANOSPERMINE INHIBITS THE FUNCTION OF THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR" BIOCHEMISTRY 1989, vol. 28, no. 19, 1989, pages 7679-7687, XP000891868 ISSN: 0006-2960 page 7683, left-hand column, paragraph 3 -page 7684, left-hand column, paragraph 1; figures 2,3	23

-/-

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEIPP STEFANIE ET AL: "Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 1997, vol. 78, no. 10, 1997, pages 2467-2476, XP002136094 ISSN: 0022-1317 the whole document	1-24
X	YEN FRANCES T ET AL: "Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein." BIOCHEMISTRY 1994, vol. 33, no. 5, 1994, pages 1172-1180, XP000891746 ISSN: 0006-2960 page 1174, left-hand column, paragraph 1 figure 1	16
A	-----	3
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199840 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1998-462789 XP002136096 & JP 10 194988 A (SUMITOMO SEIYAKU KK), 28 July 1998 (1998-07-28) abstract	8,9
P,X	AGNELLO VINCENT ET AL: "Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA OCT. 26, 1999, vol. 96, no. 22, 26 October 1999 (1999-10-26), pages 12766-12771, XP002136095 ISSN: 0027-8424 page 12678, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 2; figure 3 page 12768, left-hand column, paragraph 4; table 2	1,6,10, 14,15, 23,24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 00/02202

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5766919	A	16-06-1995	JP 5344889 A	27-12-1993
			JP 6125799 A	10-05-1994
			EP 0611393 A	24-08-1994
			WO 9325662 A	23-12-1993
			US 5552310 A	03-09-1996
WO 9425064	A	10-11-1994	AU 6943994 A	21-11-1994
US 5679342	A	21-10-1997	US 5968775 A	19-10-1999
			AT 188220 T	15-01-2000
			AU 668078 B	26-04-1996
			AU 9026791 A	11-06-1992
			CA 2095521 A	09-05-1992
			CA 2203443 A	09-05-1992
			CZ 9300824 A	13-04-1994
			DE 69131882 D	03-02-2000
			DE 69131882 T	04-05-2000
			DK 556292 T	17-04-2000
			EP 0556292 A	25-08-1993
			EP 0842947 A	20-05-1998
			ES 2139591 T	16-02-2000
			FI 932025 A	07-06-1993
			FI 971702 A	21-04-1997
			GR 3032771 T	30-06-2000
			HU 66063 A	28-09-1994
			JP 11071395 A	16-03-1999
			JP 6504431 T	26-05-1994
			NO 931680 A	28-06-1993
			NO 972213 A	14-05-1997
			PT 99466 A, B	30-10-1992
			PT 102022 A	29-01-1999
			RO 115446 B	28-02-2000
			SK 44293 A	11-08-1993
			SK 69097 A	05-11-1997
			WO 9208734 A	29-05-1992
			AT 161041 T	15-12-1997
			AU 655156 B	08-12-1994
			AU 6344990 A	03-04-1991
			CA 2064705 A, C	26-02-1991
			DE 69031791 D	22-01-1998
			DE 69031791 T	02-04-1998
			DK 414475 T	09-02-1998
			EP 0414475 A	27-02-1991
			ES 2110411 T	16-02-1998
			GR 3026114 T	29-05-1998
			JP 5502156 T	22-04-1993
			PT 95093 A, B	22-05-1991
			WO 9102820 A	07-03-1991
			AU 638719 B	08-07-1993
			AU 5812390 A	18-12-1990
			BG 60348 B	30-06-1994
			CA 2017157 A	18-11-1990
			EP 0398748 A	22-11-1990
			FI 105279 B	14-07-2000
			HU 59964 A	28-07-1992
			JP 10113176 A	06-05-1998
			JP 10000089 A	06-01-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern.

Application No

PCT/TR 00/02202

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member(s)

Publication
date

JP 10194988 A

28-07-1998

NONE

Demande internationale No
PCT/FR 00/02202

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N7/00 C12N5/10 C12N5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY
ABS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 766 919 A (YOSHIKURA HIROSHI ET AL) 16 juin 1998 (1998-06-16) colonne 5, ligne 55 -colonne 6, ligne 5 colonne 4, ligne 42-55	20-22, 24
Y	colonne 2, ligne 12 -colonne 3, ligne 5 colonne 4, ligne 17-21	1-6, 8-10, 13-15, 17-22
X	WO 94 25064 A (US ARMY) 10 novembre 1994 (1994-11-10) page 30, ligne 10 -page 31, ligne 28	20-22, 24
Y	page 8, ligne 25-31 page 9, ligne 1-7 page 9, ligne 20 -page 15, ligne 15 page 15, ligne 31 -page 16, ligne 21 revendications 3-5, 11, 14	1-6, 8-10, 13-15, 17-22

X Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

X Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T"** document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X"** document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y"** document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z"** document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/01/2001

Norm et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ALCONADA RODRIG... A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>MONAZAHIAN MASYAR ET AL: "Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY MARCH, 1999, vol. 57, no. 3, mars 1999 (1999-03), pages 223-229, XP000864507 ISSN: 0146-6615 page 225, colonne de gauche, dernier alinéa -page 226, colonne de gauche, alinéa 2; figure 2</p>	23,24
X	<p>US 5 679 342 A (WEINER AMY J ET AL) 21 octobre 1997 (1997-10-21) colonne 18, ligne 11 -colonne 20, ligne 54</p>	17,18, 20-22,24
A	<p>colonne 13, ligne 41-50</p>	7
X	<p>BUCCI CECILIA ET AL: "Free fatty acids modulate LDL receptor activity in BHK-21 cells." ATHEROSCLEROSIS APRIL, 1998, vol. 137, no. 2, avril 1998 (1998-04), pages 329-340, XP000864506 ISSN: 0021-9150 page 334, colonne de gauche -page 336, colonne de droite figures 4,7</p>	16
X	<p>KITA T ET AL: "ANTIBODY AGAINST LOW DENSITY LIPO PROTEIN RECEPTOR BLOCKS UPTAKE OF LOW DENSITY LIPO PROTEIN BUT NOT HIGH DENSITY LIPO PROTEIN BY THE ADRENAL GLAND OF THE MOUSE IN-VIVO" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1981, vol. 256, no. 10, 1981, pages 4701-4703, XP000864537 ISSN: 0021-9258 figures 2,3</p>	23
X	<p>EDWARDS E H ET AL: "CASTANOSPERMINE INHIBITS THE FUNCTION OF THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR" BIOCHEMISTRY 1989, vol. 28, no. 19, 1989, pages 7679-7687, XP000891868 ISSN: 0006-2960 page 7683, colonne de gauche, alinéa 3 -page 7684, colonne de gauche, alinéa 1; figures 2,3</p>	23

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SEIPP STEFANIE ET AL: "Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 1997, vol. 78, no. 10, 1997, pages 2467-2476, XP002136094 ISSN: 0022-1317 le document en entier	1-24
X	YEN FRANCES T ET AL: "Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein." BIOCHEMISTRY 1994, vol. 33, no. 5, 1994, pages 1172-1180, XP000891746 ISSN: 0006-2960 page 1174, colonne de gauche, alinéa 1	16
A	figure 1	3
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199840 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1998-462789 XP002136096 & JP 10 194988 A (SUMITOMO SEIYAKU KK), 28 juillet 1998 (1998-07-28) abrégé	8,9
P,X	AGNELLO VINCENT ET AL: "Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA OCT. 26, 1999, vol. 96, no. 22, 26 octobre 1999 (1999-10-26), pages 12766-12771, XP002136095 ISSN: 0027-8424 page 12678, colonne de gauche, dernier alinéa -colonne de droite, alinéa 2; figure 3 page 12768, colonne de gauche, alinéa 4; tableau 2	1,6,10, 14,15, 23,24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs au

libres de familles de brevets

Internationale No

PCT/FR 00/02202

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5766919 A	16-06-1998	JP 5344889 A	27-12-1993
		JP 6125799 A	10-05-1994
		EP 0611393 A	24-08-1994
		WO 9325662 A	23-12-1993
		US 5552310 A	03-09-1996
WO 9425064 A	10-11-1994	AU 6943994 A	21-11-1994
US 5679342 A	21-10-1997	US 5968775 A	19-10-1999
		AT 188220 T	15-01-2000
		AU 668078 B	26-04-1996
		AU 9026791 A	11-06-1992
		CA 2095521 A	09-05-1992
		CA 2203443 A	09-05-1992
		CZ 9300824 A	13-04-1994
		DE 69131882 D	03-02-2000
		DE 69131882 T	04-05-2000
		DK 556292 T	17-04-2000
		EP 0556292 A	25-08-1993
		EP 0842947 A	20-05-1998
		ES 2139591 T	16-02-2000
		FI 932025 A	07-06-1993
		FI 971702 A	21-04-1997
		GR 3032771 T	30-06-2000
		HU 66063 A	28-09-1994
		JP 11071395 A	16-03-1999
		JP 6504431 T	26-05-1994
		NO 931680 A	28-06-1993
		NO 972213 A	14-05-1997
		PT 99466 A, B	30-10-1992
		PT 102022 A	29-01-1999
		RO 115446 B	28-02-2000
		SK 44293 A	11-08-1993
		SK 69097 A	05-11-1997
		WO 9208734 A	29-05-1992
		AT 161041 T	15-12-1997
		AU 655156 B	08-12-1994
		AU 6344990 A	03-04-1991
		CA 2064705 A, C	26-02-1991
		DE 69031791 D	22-01-1998
		DE 69031791 T	02-04-1998
		DK 414475 T	09-02-1998
		EP 0414475 A	27-02-1991
		ES 2110411 T	16-02-1998
		GR 3026114 T	29-05-1998
		JP 5502156 T	22-04-1993
		PT 95093 A, B	22-05-1991
		WO 9102820 A	07-03-1991
		AU 638719 B	08-07-1993
		AU 5812390 A	18-12-1990
		BG 60348 B	30-06-1994
		CA 2017157 A	18-11-1990
		EP 0398748 A	22-11-1990
		FI 105279 B	14-07-2000
		HU 59964 A	28-07-1992
		JP 10113176 A	06-05-1998
		JP 10000089 A	06-01-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres et familles de brevets

Dema

rnationale No

PCT/FK 00/02202

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 10194988 A	28-07-1998	AUCUN	